



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020020044745 A
(43)Date of publication of application:
19.06.2002

(21)Application number: 1020000073826
(22)Date of filing: 06.12.2000

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF
ORIENTAL MEDICINE
(72)Inventor: HA, HYE GYEONG
KIM, JEONG SUK
SONG, GYE YONG

(51)Int. Cl. A61K 35 /78

(54) SOPHORAE FLOS EXTRACT HAVING PREVENTING AND TREATING EFFECT ON OSTEOPOROSIS

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a process of preparing a Sophorae Flos extract containing a large amount of phytoestrogen useful for preventing and treating osteoporosis. Whereby, the extract can be effectively used as health food as well as a therapeutic agent for osteoporosis. CONSTITUTION: Sophorae Flos is soaked in 10 to 100% alcohol aqueous solution at 5 to 40deg.C and hydrolyzed in 0.1 to 2N acid or base solutions to produce a Sophorae Flos extract containing genistein or formononetin. The acid is hydrochloric acid or sulfuric acid, and the base is sodium hydroxide or potassium hydroxide.

copyright KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (20001206)
Notification date of refusal decision (00000000)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (20030129)
Patent registration number (1003808650000)
Date of registration (20030407)
Number of opposition against the grant of a patent ()
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
Number of trial against decision to refuse ()
Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 35/78

(11) 공개번호 특2002-0044745
(43) 공개일자 2002년06월19일

(21) 출원번호 10-2000-0073826
(22) 출원일자 2000년12월06일

(71) 출원인 한국 한의학 연구원
신민규
서울 강남구 청담1동 129-11 청암빌딩 6층

(72) 발명자 김정숙
서울특별시강남구압구정1동현대아파트24동102호
하혜경
서울특별시도봉구도봉1동서울가든아파트1동408호
송계용
서울특별시서초구방배1동922-6

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 골다공증 예방 및 치료에 효과를 갖는 피화 추출물

요약

본 발명은 골다공증 예방 및 치료에 효과를 갖는 피화 (Sophorae Flos) 추출물에 관한 것으로서, 구체적으로 피화 추출물에는 제니스테인 (genistein)과 포르모노네티 (formononetin) 등의 식물 에스트로젠 (phytoestrogen)이 다량 포함되어 있으므로, 본 발명에 의한 피화 추출물은 골다공증 치료제 또는 예방제로서 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 건강 식품으로도 응용될 수 있다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 골다공증 예방 및 치료에 효과를 갖는 피화 (Sophorae Flos) 추출물에 관한 것으로서, 구체적으로 피화 추출물에는 제니스테인 (genistein)과 포르모노네티 (formononetin) 등의 식물 에스트로젠 (phytoestrogen)이 다량 포함되어 있으므로, 본 발명에 의한 피화 추출물은 골다공증 치료제 또는 예방제로서 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 건강 식품으로도 응용될 수 있다.

골다공증 (osteoporosis)은 골 조직의 석회가 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강 (骨髓腔)이 넓어지는 상태로, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준 (bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14~18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로젠 농도가 급속히 감소하는데, 이 때 IL-7 (interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림파구 (B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수 (bone marrow)에 B 세포 전구체 (pre-B cell)가 축적되고 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골 세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 된다.

이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 또한 전세계적으로 골 질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골 질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 물질로는 에스트로젠 (estrogen), 앤드로제닉 아나볼릭 스테로이드 (androgenic anabolic steroid), 칼슘 제제, 인산염, 불소 제제, 이프리플라본 (Ipriflavone), 비타민 D₃ 등이 있다. 또한 1995년 미국 머크사에서는 아미노비스포스포네이트 (aminobisphosphonate)를, 1997년 미국 릴리사 (Lilly Co.)에서는 선택적인 에스트로젠 수용체 조절기 (selective estrogen receptor modulator, SERM)로서의 역할을 하는 랄록시펜 (raloxifene)을 골다공증에 대한 신약으로 개발한 바 있다.

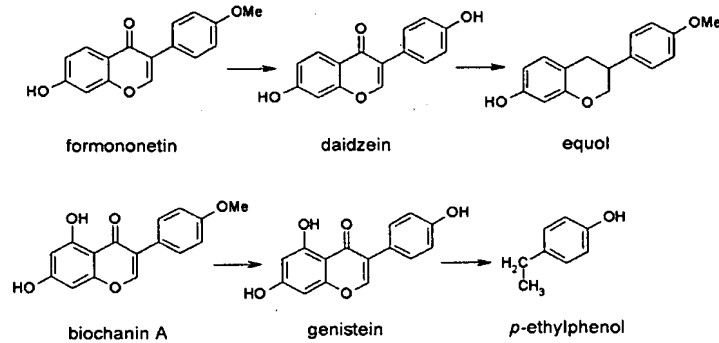
한편 종래 골다공증 치료제는 대부분 에스트로젠 계통의 물질로서, 에스트로젠 계통의 물질은 장기 투여할 경우 암, 담석, 혈전증 등의 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나 골다공증은 약물의 단기 투여만으로는 치료할 수 없으며 약물의 장기 투여가 필수적이다. 따라서 약물을 장기 투여할 때에도 상기와 같은 부작용이 없고 에스트로젠을 대체할 수 있을 만큼 우수한 약효를 갖는 새로운 물질을 개발하고자 하였으며, 현재 에스트로젠 대체 물질로 관심의 초점이 되고 있는 것 중의 하나가 대두 이소플라본 (soybean isoflavone) 등의 식물 에스트로젠 (phytoestrogen)이다.

식물 에스트로젠은 1946년 베네트 등에 의해 최초로 보고되었는데, '클로바 병 (clover disease) [붉은 클로바종 (red clover, Trifolium subterraneum var. Dwalganup)에 속하는 식물을 먹은 양은 불임률이 30% 이상 증가되어, '클로바 병'이라 명명됨]의 원인이 이 식물에 함유된 성분 중 에스트로젠과 유사한 이소플라보노이드 (isoflavonoid)임을 밝히고 식물에서 얻어낸 이러한 화합물을 식물 에스트로젠이라 명명하였다.

식물 에스트로젠으로 알려진 물질로는 다이드제인 (daidzein), 제니스테인 (genistein), 포르모노네티 (formononetin), 비오카닌 A (biochanin A) 등의 이소플라본 (isoflavanone)류 화합물, 쿠메스트롤 (coumestrol) 등의 쿠메스탄 (coumestan)류 화합물, 엔테롤락톤 (enterolactone) 등의 리그난 (lignan)계 화합물 및 엔테로디올 (enterodiol) 등의 페놀 (phenol)계 화합물이 있다. 이들 식물 에스트로젠은 대개 아글리콘 (aglycone), 6'-O-아세틸글루코시드 (6'-O-acetylglucoside), 6'-O-말로닐글루코시드 (6'-O-malonylglucoside) 등의 형태로 존재하며, 다이드제인과 제니스테인은 7-O-글루코시드 (7-O-glucoside)의 형태로 존재한다. 상기 화합물들 중 당 화합물은 장내 박테리아의 β -글루코시다제 (β -glucosidase) 또는 위산에 의해 가수분해되어, 결국 유리 (free) 이소플라본인 아글리콘의 형태로 흡수되는 것으로 알려져 있다.

한편 상기 이소플라본류 화합물 중 포르모노네틴은 다이드제인의 전구체로서 포르모노네틴 벤젠 고리의 메톡시기가 디메틸레이션 (demethylation)되면 다이드제인으로 변환되며, 다이드제인의 케톤기가 제거되면 에콜로 변환된다. 또한 비오카닌 A는 제니스테인의 전구체로서 비오카닌 A 벤젠 고리의 메톡시기가 디메틸레이션되면 제니스테인으로 변환된다.

반응식 1



식물 에스트로젠은 일반적으로 동물의 에스트로젠과 유사한 작용을 나타내는데, 에스트로젠 수용체에 결합하여 유방암 세포의 성장을 억제하며 폐경기 이후 나타나는 심혈관 질환 (cardiovascular disease) 및 기타 증상의 치료에 에스트로젠을 대체하여 사용될 수 있다. 또한 현재 대두 식품을 많이 섭취하는 동양 여자는 미국인에 비해 에스트로젠 부족에 기인하는 골다공증과 심장병의 발현이 적은 것으로 보고되었다 (Y. Ishimi et al., Selective Effects of Genistein, a Soybean Isoflavone, on B-Lymphopoiesis and Bone Loss Caused by Estrogen Deficiency, *Endocrinol.*, 140(4): 1893-1900, 1999). 이 원인이 식물 에스트로젠인 다이드제인이나 제니스테인의 투여 때문인지 아니면 유전적인 요인인지는 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나, 골다공증 예방 및 치료에 대한 식물 에스트로젠의 유용함을 뒷받침하는 하나의 근거가 되고 있다.

제니스테인은 골 재흡수 속도 (bone resorption rate)와 골 형성 속도 (bone formation rate)에도 영향을 미치는데, 5 $\mu\text{g/g}$ 투여군에서는 골 형성 속도가 증가하였다 (Fanti, M. C. et al., The Phytoestrogen Genistein Reduces Bone Loss in Short-Term Ovariectomized Rats, *Osteoporos Int.* 8:274-281, 1998). 제니스테인을 두개관 세포 배양 (calvarial cell culture)에 적용한 경우 파골 세포의 생성이나 골 소실에 직접 작용하지는 않았다. 한편 제니스테인 100~200 $\mu\text{g/kg}$ 을 3일간 투여하면 대퇴 골중간부 (femoral metaphyseal)와 대퇴 골간 (femoral diaphyseal)의 알칼리 포스파타제 (alkaline phosphatase, 이하 "ALP"라 약칭함), DNA 및 칼슘 농도가 증가하였고, 50 $\mu\text{g/kg}$ 을 투여하면 ALP와 DNA의 농도만 증가하고 칼슘 농도에는 변화가 없었다. 그러나 아연 5.5 mg/kg를 제니스테인과 함께 투여하면 ALP, DNA 및 칼슘 농도가 모두 증가하였다. 즉, 제니스테인은 뼈에 대해 동화 작용 (anabolic effect)을 나타내며, 이러한 동화 작용은 아연으로 인해 증가되고 골 단백질의 생성을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다 (Gao, Y. H. et al., Zinc Enhancement of Genistein's Anabolic Effect on Bone Components in Elderly Female Rats, *Gen. Pharmac.* 31(2): 199-202, 1998).

시험관 내 (in vitro) 실험에서도 제니스테인 ($10^{-5} \sim 10^{-8}$ M)은 골중간부 조직 (metaphyseal tissue)의 ALP, DNA 및 칼슘 농도를 증가시켰고 아연 (10^{-5} M)을 함께 가할 경우 그 효과는 더욱 증가되었다. 또한 다이드제인의 전구 물질인 람록시펜은 골 소실을 방지하는 한편 자궁에 영향을 미치지 않으면서도 에스트로젠 효과 (estrogenic effect)를 나타내었다 (Ishimi, Y. et al., Selective Effects of Genistein, a Soybean Isoflavone, on B-Lymphopoiesis and Bone Loss Caused by Estrogen Deficiency, *Endocrinol.*, 140(4): 1893-1900, 1999).

한편 인간 골아세포 (human osteoblastic cell)와 골수의 골간 스트로말 (bone marrow osteoprogenitor stromal: HBMS) 세포의 1차 세포 배양 (primary cell culture)에 IL-1 β 를 첨가하면 투여량 의존적 (dose-dependent) 또는 시간 의존적으로 IL-8 mRNA의 양이 증가한다. 이 때, 글루코코르티코이드 (glucocorticoids), 덱사메타손 (dexamethasone) 및 코르티손 (cortisone)은 IL-1 β 에 의해 IL-8의 양이 증가하는 것을 억제하였으며, PTH (parathyroid hormone) (10^{-7} , 10^{-8} M)은 IL-8에 전혀 영향을 미치지 않았다. 또한 제니스테인 (100 μ M)도 IL-1 β 에 의해 IL-8이 증가하는 것을 억제하여, IL-1 β 에 의한 IL-8의 조절이 신호 변환 경로 (signal transduction pathway)를 통해 진행된다는 것을 알 수 있었다 (Chaudhary, L. R. et al., Regulation of Interleukin-8 Gene Expression by Interleukin-1 β , Osteotropic Hormones and Protein Kinase Inhibitors in Normal Human Bone Marrow Stromal Cells, J. Bio. Chem., 271(28): 16591-16596, 1996).

PDGF (platelet-derived growth factor)와 IGF-II (insulin-like growth factor-II)는 MG-63 세포와 조골세포 (osteoblast) 1차 배양에서 강력한 미토겐 (mitogen)으로 작용하는데, 이 두 물질을 제니스테인과 함께 투여한 경우 PDGF를 포함하는 시험군에서는 IP3 (inositol trisphosphate)가 증가되었으나 IGF-II를 포함하는 시험군에서는 IP3가 증가되지 않았다. 즉, 제니스테인은 PDGF에 의한 인산화 (phosphorylation) 및 미토겐으로서의 작용은 억제하였으나 IGF-II에는 영향을 미치지 않았으며, 따라서 제니스테인이 특정한 티로신 키나제에만 작용한다는 것을 알 수 있었다.

제니스테인의 파골세포에 의한 골 재흡수 (bone resorption)에 대한 실험에서 IC₅₀은 3 μ mol/L로 측정되었으며, 10 μ M에서 생체내 (in vivo) 및 시험관내 (in vitro) 실험에서 파골세포에 대한 활성 (osteoclastic activity)을 억제하였다. 반면 다이드제인은 30 μ M에서 골 재흡수에 대한 효과가 없었으며, 10^{-8} ~ 10^{-10} M의 세포 배양액에서는 골 재흡수를 촉진시켰다 (J. P. Williams, et al., Tyrosine Kinase Inhibitor Effects on Avian Osteoclastic acid Transport. Am. J. Clin. Nutr., 68(suppl): 1369S-74S, 1998; H. Tobe, et al., Daidzein Stimulation of Bone Resorption in Pit Formation Assay. Bioscience Biotech. and Biochem., 61(2): 370-371, 1997).

한편 이프리플라본 (Ipriflavone) 등과 같은 이소플라본류는 에스트로젠 수용체에 직접적으로는 작용하지 않는다는 보고도 있으나, 골량의 소실을 억제하며 특히 짧은 기간 안에 골 생성을 촉진시켜 골량의 감소를 억제하는 것으로 알려져 있다.

이처럼 식물 에스트로젠이 뼈에 미치는 영향은 일부 상반된 점도 있지만 전체적으로 골밀도 (bone mineral density: BMD)를 증가시키는 것으로 보고되고 있으며 계속하여 많은 연구가 진행되고 있다.

인간 자궁 선암 세포 (human endometrial adenocarcinoma cell)에서 식물 에스트로젠에 의한 ALP 활성을 골다공증 치료제로서 사용되고 있는 에스트라디올 (estradiol)을 기준으로 하여 비교해 보면, 쿠메스트롤 5×10^{-2} 배, 제니스테인과 에콜 (equol) 10^{-3} 배, 다이드제인 7×10^{-3} 배, 비오키닌 A 1.5×10^{-4} 배, 포르모노네티 10^{-5} 배이다. 그러나 자궁 (uterus)에 미치는 에스트로젠 활성 (estrogenic activity)은 디에틸stil베스트롤 (diethylstilbestrol)을 기준으로 할 때, 쿠메스트롤 3.5×10^{-4} 배, 제니스테인 10^{-5} 배, 다이드제인 7.5×10^{-6} 배, 비오키닌 A 4.6×10^{-6} 배, 포르모노네티 2.6×10^{-6} 배 정도로 상당히 낮았다. 에스트로젠 효과 (estrogenic effect)를 나타내는 양은 쿠메스트롤과 포르모노네티의 경우 각각 알팔파 (alfalfa) 5 g, 9,412 g이고 제니스테인과 다이드제인의 경우 각각 두부 48 g, 145 g이었다.

한편 식물 에스트로젠을 상용하는 동물들은 일반적으로 식물 에스트로젠의 혈중 농도가 높기 때문에 불임 등의 문제를 유발할 수도 있으며, 식물 에스트로젠은 항에스트로젠 활성 (anti-estrogenic effect)을 나타내기도 하므로 자궁과 같이 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor)의 밀도가 높은 조직이나 장기에는 큰 영향을 미칠 수도 있다. 난소가 제거되면 골밀도 (bone mineral density: BMD)가 감소하는데, 제니스테인을 난소 제거 쥐 (OVX)에 투여한 결과, 골수 세포 (bone marrow cell)의 수를 감소시키고 자궁의 무게는 증가시키지 않으면서도 BMD를 증가시켰다. 또한 이 결과는 소주골 (trabecular bone)의 국소 해부 (microcomputed tomography)와 조직 분석 (histological analysis)에서도 확인할 수 있었다. 이러한 제니스테인의 작용 기전은 티로신 키나제 저해제 (tyrosine kinase inhibitor)뿐만 아니

라 파골 세포의 골소실 활성에 기인하는 작용일 수도 있다. 반면 난소 제거 쥐에게 제니스테인을 1 mg/kg 또는 5 mg/kg 투여하면 BMD의 감소가 억제되었으며 골 재흡수보다는 골 형성이 증가되었다. 또 다른 보고에 의하면 제니스테인은 투여량 의존적으로 (dose-dependent) 약효에 변화가 있는 것으로 나타났다. 즉, 난소 제거 쥐에 제니스테인을 25 μ g/g 투여하면 자궁에 영향을 미쳤으나, 5 μ g/g 투여하면 자궁에는 영향을 미치지 않고 BMD를 더 증가시켰으며, 1 μ g/g 투여하면 자궁과 BMD 모두에 영향이 미치지 않았다.

또한 폐경기 여성에게 제니스테인을 매일 90 mg씩 6개월간 투여했을 때에도 BMD의 증가가 확인되었다. 콩가루 (soy flour) (다이드제인 포함) 6주 투여로는 얼굴 홍조 (hot flush)를 40%나 감소시켰는데 이 결과는 노 중에 함유된 에콜의 배설량과도 일치하였으며, 밀가루 (wheat flour)는 엔테롤락톤 (enterolactone)을 함유하며 얼굴 홍조를 25%나 감소시켰다. 그러나 제니스테인을 소량 투여하면 (0.5 mg/일) 에스트로젠과 유사한 작용을 나타내지만 (에스트로젠 수용체에 작용 물질 (agonist)로 작용) 높은 양 (5 mg/kg)에서는 역효과 (adverse effect)가 더 크다는 보고도 있다 (Anderson, J. J. B. et al., Biphase Effects of Genistein on Bone Tissue in the Ovariectomized, Lactating Rat Model, P.S.E.B.M., 217, 345-350, 1998).

각각 50 mg씩 이소플라본을 투여할 경우, 제니스테인과 다이드제인의 최고 혈장 농도는 각각 130~640 ng/ml, 반감기는 약 7~8시간인 것으로 알려져 있다. 또한 배당체 (glycosides)의 생물학적 이용 효능 (bioavailability)이 아글리콘보다 높아서, 소변으로 배설되는 양은 제니스테인 24%, 다이드제인 66%, 에콜 28%이다. 제니스테인, 다이드제인 및 에콜의 흡수 반감기는 1.5~3 시간이며, 소변으로 배설되는 반감기는 각각 7, 4, 9 시간인 것으로 보고되었다 (2nd International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease, Brussels, Belgium, 1996).

한편 상기와 같이 다양한 효능, 특히 골다공증 치료 및 예방에 효과를 나타내는 이소플라본을 에스트로젠의 대체 물질로서 사용하기 위해서는 다량의 화합물을 확보할 필요가 있으며, 이소플라본은 주로 식물에서 추출되어 사용되고 있다. 따라서 이소플라본을 다량 얻을 수 있는 공급원을 찾는 것이 중요하다.

현재 이소플라본은 주로 콩과 (Leguminosae family) 식물에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 본 발명자들을 비롯한 국내외 몇몇 연구팀이 한국의 전통 식품 중 콩의 가공 식품과 발효 식품에 함유된 이소플라본의 함량을 정량한 바 있다. 구체적으로 한국의 전통 식품인 두부, 콩나물, 된장, 간장, 청국장, 춘장, 메주, 대두, 완두콩, 약콩, 강남콩 등에 함유된 이소플라본 중에서 제니스테인, 다이드제인, 포르모노네티를 정량하였다. 이 때 이소플라본의 혈중농도와 소변에 배설된 양을 분석하였으며, 정량 분석 방법으로 자외선 분광기, ECD (electrochemical detector) 분광기 또는 형광 분광기 등의 검출기를 이용한 HPLC (high pressure liquid chromatography), 또는 기체 크로마토그래피나 RIA (radio immunoassay) 분석법 등이 사용되었다.

18여 종의 대두에 대하여 식물 에스트로젠 중 제니스테인과 다이드제인을 분석한 결과에 의하면, 대두에는 제니스테인 318~1107 mg/kg, 다이드제인 379~1242 mg/kg 포함되어 있으며; 그 중에서도 대두 품종의 하나인 단엽의 이소플라본 양이 제일 많아서 전체 콩가루 (soy flour)에 대하여 2317 mg/kg 포함되어 있었다 (J. S. Choi, T-W Kwon, and J-S Kim: Isoflavone Contents in some Varieties of Soybean, Foods and Biotechnology, 5(2): 167-169, 1996). 또한 콩의 가공 식품에서도 식물 에스트로젠 농도가 높아, 국내산 액상 두유에는 다이드제인 약 309 mg/kg (이하 특별한 언급이 없는 한 건조량 기준임), 제니스테인 약 367 mg/kg, 두부에는 다이드제인 584 mg/kg, 제니스테인 568 mg/kg, 연두부에는 다이드제인 566 mg/kg, 제니스테인 625 mg/kg 및 순두부에는 다이드제인 817 mg/kg, 제니스테인 702 mg/kg이 포함되어 있었다. 한편 콩나물의 경우 (건조량)에는 다이드제인 194 mg/kg, 제니스테인 230 mg/kg 포함되어 있었는데, 대두가 발아하면 이소플라본의 농도가 증가 한다고 알려져 있다 (최연배, 손현수: 대두 가공 식품 중의 이소플라본 함량, Kor. J. Food Sci. Technol. 30(4): 745-750, 1998).

한편 괴화 (Sophorae Flos)은 < 대한약전 > 에 의하면 회화나무 (Sophora japonica L.)의 꽃봉오리이다. 괴화는 그 성질이 차서 대장의 열을 청열시켜 줌으로써 지혈시키는 작용을 하므로 한방에서는 하부의 출혈증에 사용하는데, 구체적으로 치질로 인한 출혈, 빈혈, 대장출혈, 자궁출혈 뿐만 아니라 코피나 토혈 등의 출혈증에 널리 사용되고 있다. 또한 괴화는 혈분의 열로 인한 어지러움증이나 안구 출혈 두통 등에 사용되며 (본초학, 393-5, 1995), 본초강목에서는 목소리가 나오지 않는 것과 목이 아픈 것을 치료하고 토혈, 코피, 자궁 출혈도 치료한다고 되어 있다.

그러나 아직까지 골다공증 예방 또는 치료와 관련하여 괴화를 사용한 예는 보고된 바 없다.

이에 본 발명자들은 골다공증 예방제 또는 치료제로 사용할 수 있는 식물 에스트로겐의 공급원으로서 대두를 대체할 수 있는 것을 찾고자 노력하던 중 전통 한약재에 대한 검색을 실시하였으며, 그 중 괴화 추출물에 다량의 식물 에스트로겐이 포함되어 있는 것을 알아내고 괴화 추출물을 골다공증 치료제 또는 예방제 및 건강 식품으로서 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 골다공증 예방 및 치료에 유용한 식물 에스트로겐 성분을 다량 함유하고 있는 괴화 추출물 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 괴화 추출물을 골다공증 치료제 또는 예방제 및 건강 식품으로 이용하는 용도를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 골다공증 (osteoporosis) 예방 및 치료에 효과를 갖는 괴화 (Sophorae Flos) 추출물을 제공한다.

상기 괴화 추출물은 제니스테인 (genistein)과 포르모노네티 (formononetin) 등의 식물 에스트로겐 (phytoestrogen)을 다량 포함하고 있는 것이 특징이다.

종래 식물 에스트로겐의 공급원으로서 주로 사용되고 있던 대두 추출물과 상기 괴화 추출물을 비교해 보면, 괴화 추출물에는 제니스테인과 포르모노네티 등의 식물 에스트로겐이 월등히 많이 포함되어 있다. 또한, 괴화 추출물의 수율은 괴화 건조물에 대하여 13.64 ± 0.40 %로 매우 높고 대두에 비해 괴화의 값이 더 저렴하므로, 괴화 추출물은 대두 추출물보다 유용한 식물 에스트로겐의 공급원으로 사용될 수 있다.

본 발명에서는 또한 상기 괴화 추출물의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 제조방법에 의하면 상기 괴화 추출물은 식물 에스트로겐 화합물을 유리 화합물 (free compound)의 형태 및 당과 결합된 형태로 포함할 수도 있으며, 또한 가수분해에 의해 전체 식물 에스트로겐 화합물을 유리 화합물의 형태로 포함할 수도 있다.

구체적으로 본 발명에서는 괴화 건조물을 10~100% 알코올 수용액에 넣고 5~40 °C에서 침지하여 상기 괴화 추출물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법에 의하면, 괴화 추출물에는 유리 화합물 형태인 식물 에스트로겐 화합물과 당과 결합된 형태의 식물 에스트로겐 화합물이 모두 포함된다.

또한 본 발명에서는 괴화 건조물을 산 또는 염기로 가수분해하여 상기 괴화 추출물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 때 상기 산 또는 염기는 0.1~2 N인 것이 바람직하며, 산은 염산 또는 황산이고 염기는 수산화나트륨 또는 수산화칼륨인 것이 바람직하다. 이 방법에 의하면, 당과 결합되어 있던 식물 에스트로겐 화합물이 가수분해되어 괴화 추출물에는 식물 에스트로겐 화합물이 유리된 형태로 포함된다.

본 발명에서는 또한 상기 괴화 추출물을 유효 성분으로 함유하는 골다공증 치료제 또는 예방제용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에 의한 괴화 추출물은 식물 에스트로겐의 단일 화합물과 비교해 볼 때, 골다공증 치료 또는 예방의 효과가 월등히 높다.

상기 괴화 추출물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

즉, 본 발명의 괴화 추출물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 괴화 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 또한 골다공증 예방 및 치료제로서의 효능 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D₃를 첨가할 수 있다.

투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

괴화 추출물의 유효용량은 1 ~ 600 mg/kg이고, 바람직하기로는 10 ~ 100 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

본 발명의 괴화 추출물을 마우스에 경구 투여시 및 복강내 투여시의 독성 실험을 수행한 결과, 경구 독성시험에 의한 50% 치사량(LD₅₀)은 적어도 15.0 g/kg 이상인 것으로 나타났다.

또한 본 발명에서는 상기 괴화 추출물을 유효 성분으로 함유하는 건강 식품을 제공한다.

이 때, 괴화 추출물을 함유하는 건강 식품으로는 쥬스 주성분으로 한 차, 젤리, 즙, 주스, 엑기스, 국수, 냉면, 숙취 해소음료, 갈증해소제, 근육통 완화를 목적으로 하는 민간요법제, 감기 예방 및 증상 개선을 목적으로 하는 민간요법제, 위장 개선 완화제 등을 들 수 있다. 또한 가감사물탕(加減四物湯)(1), 가감통성산(加減通聖散), 가감통성환(加減通聖丸), 가미향소산(加味香蘇散), 괴화(槐花)(1), 괴화(槐花)(2), 괴화(槐花)(3), 괴화산(槐花散)(1), 괴화산(槐花散)(2), 괴화산(槐花散)(3), 괴화주(槐花酒), 괴황탕(槐黃湯), 괴황환(槐黃丸), 궁귀환(芎歸丸), 기각산(枳殼散)(2), 당귀화혈탕(當歸和血湯), 도적지유탕(導赤地榆湯), 돈위환(豚胃丸), 목적(木賊)(2), 밀몽화산(密蒙花散)(1), 백엽탕(柏葉湯), 양혈지황탕(涼血地黃湯)(2), 연각환(連翹丸), 옥지산(玉池散), 위피환(??皮丸), 이괴단(二槐丹), 장풍흑산(腸風黑散), 지혈산(止血散), 청영괴화음(淸榮槐花飲), 해독탕(解毒湯)(1), 향부산(香附散)(2), 향표탕(香?湯), 형괴산(荊槐散), 환골환(換骨丸), 화생보명단(回生保命丹) 등과 같은 여러 한의학 처방들에도 사용할 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다.

단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1> 괴화 추출물의 제조 1

괴화 건조물 (중국산) 분말 50 g을 70% 메탄올 수용액 500 ml에 넣고 실온에서 2일 동안 교반시켰다. 2일 후 용액을 거름종이로 여과한 후 감압 농축하여 메탄올을 제거한 뒤 동결 건조하여 수분을 제거하였다. 이 방법에 의해 식물 에스트로젠 화합물이 유리 화합물의 형태 및 당과 결합된 형태 두 가지로 존재하는 괴화 추출물 6.82 ± 0.20 g (괴화 건조물에 대한 수율 : 13.64 ± 0.40 %)을 얻었다.

< 실시예 2> 괴화 추출물의 제조 2

괴화 건조물 (중국산) 분말 0.1 g을 1 N HCl 수용액 1 ml에 넣고 100 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 2시간 동안 가수분해시킨 뒤 동결 건조하여 수분을 제거하여 괴화 추출물을 제조하였다.

< 비교예 1> 대두 추출물의 제조 1

대두 (한국 문경산, 농협 하나로양곡)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법에 의해 대두 추출물을 제조하였다.

< 비교예 2> 대두 추출물의 제조 2

대두 (한국 문경산, 농협 하나로양곡)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법에 의해 대두 추출물을 제조하였다.

< 실시예 3> 괴화 추출물의 분석

하기와 같은 방법에 의해, 상기 실시예 1 내지 2에서 얻은 괴화 추출물 및 비교예 1 내지 2에서 얻은 대두 추출물에 포함된 식물 에스트로젠을 분석하였다.

< 3-1> 분석 시료의 제조

상기 실시예 1에서 얻은 괴화 추출물 30 mg, 비교예 1에서 얻은 대두 추출물 300 mg을 각각 메탄올 600 μ l에 넣어 녹인 후 4 °C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 취해 0.45 μ m의 주사기용 필터로 여과하여 분석 시료를 제조하였다.

또한 실시예 2에서 얻은 괴화 추출물을 건조약재 해당 60 mg, 비교예 2에서 얻은 대두 추출물 300 mg을 각각 100% HPLC 시약용 메탄올 600 μ l에 가하고 초음파 추출 (sonication)을 1시간 동안 행한 후 추출액 1 ml를 취하여 4 °C, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 그 상등액 500 μ l를 취하여 0.45 μ m의 주사기용 필터로 여과하여 분석 시료를 제조하였다.

< 3-2> 시료의 분석

상기에서 제조된 시료에 대하여 HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Thermo Separation Products, Fremont, CA, 미국, 모델명 spectra system P1000)를 실시하여, 피화 추출물에 포함된 식물 에스트로겐의 종류 및 함유량을 분석하였다. 이동상으로는 5 mM NaH₂PO₄ (pH 4.6) : 메탄올 = 4 : 6의 혼합 용액을 사용하고, 칼럼으로는 Luna 5 µm C18 (250 × 4.6 mm)을 사용하였으며 유속은 1 ml/분으로 하였다. 내부 표준 물질은, 상기 이동상에서 포르모노네틴의 머무름 시간 (retention time) 및 꼬리 끌림 (tailing)과 다른 물질들의 머무름 시간이 내부 표준 물질의 머무름 시간과 겹치는 지 고려하여 알로에-에모딘 (aloe-emodin)을 선택하였다. 또한 표준 물질로 알로에-에모딘, 제니스테인, 다이드제인 (이상 모두 Sigma사, St. Louis, MO, 미국)을 사용하였으며, 포르모노네틴은 본 발명자들이 황기에서 추출·정제하고 NMR, MASS로 확인한 후에 사용하였다. 다이드제인 (0.051~213.71 µg/ml), 제니스테인 (0.056~194.20 µg/ml), 및 포르모노네틴 (0.025~5.00 µg/ml)을 메탄올을 사용하여 각각 여러 농도로 희석하고 내부 표준 물질인 알로에-에모딘 (4 µg/ml)을 표준 물질과 동량 첨가하여 용액을 제조하였다. 이 용액을 20 µl씩 HPLC에 주입하여 각각의 크로마토그램을 얻었으며, 260 nm에서의 흡광도로써 검출하였다. 여러 농도에서 다이드제인, 제니스테인, 포르모노네틴의 피크 높이를 각각 내부 표준 물질의 피크 높이에 대한 비율 (peak height ratio)로 계산하여 표준 검량 곡선을 작성하였으며, 이들에 대한 검량곡선식 및 상관계수는 Sigmaplot® 프로그램 (Jandel Scientific, Chicago, IL, U.S.A.)으로 구하였다.

그 결과, 본 발명의 피화 추출물에 포함된 식물 에스트로겐의 양을 하기표 1에 나타내었다. 비교예로는 비교예에서 얻은 대두 추출물을 사용하였다.

[표 1]

식물 에스트로겐의 함유량

피화 추출물		대두 추출물	
다이드제인	유리 화합물(실시예 1)	-	14.52±1.75
전체량(실시예 2)	-	-	1022.15±201.08
제니스테인	유리 화합물(실시예 1)	9.27±2.59	22.49±2.81
전체량(실시예 2)	248.44±52.16	-	408.58±92.05
포르모노네틴	유리 화합물(실시예 1)	0.50±0.07	0.0606±0.0341
전체량(실시예 2)	ND	-	0.1613±0.132
단위 : mg/kg * ND : 측정안됨 (not detected)			

상기표 1에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 의한 피화 추출물에는 다량의 식물 에스트로젠 화합물이 포함되어 있었다. 특히 포르모노네틴의 경우 피화 추출물은 대두 추출물에 비하여 유리 화합물의 형태로 약 8.3배 이상 포함되어 있었다.

이와 같이 본 발명에 의한 피화 추출물에는 제니스테인과 포르모노네틴 등의 식물 에스트로겐이 다량 함유되어 있으므로, 본 발명의 피화 추출물은 골다공증 치료제 또는 예방제로서 뿐만 아니라 건강 식품으로도 유용하게 사용될 수 있다.

< 실험예 1> 조골세포 증식 실험

본 발명에 의한 피화 추출물이 조골세포 (osteoblast)의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 실시하였다.

< 1-1> 조골세포의 선별 및 세포 배양

뼈의 구성 성분인 조골세포와 유사한 성질을 나타내는 Saos-2 세포주를 서울대학교 의과대학 암 연구소의 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

Saos-2 세포는 10% FBS, 페니실린 100 유닛/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml를 포함하는 RPMI 1640배지 (Gibco BRL, 미국)를 사용하여 습식 조건, 37℃로 5% CO₂ 배양기 (incubator)에서 배양하였다. 배지는 1주일에 2~3회 교환하였고 1주일에 1회 계대배양하였다. 상기 세포주는 배양 플라스크에 단일층 (monolayer)을 형성하며 자라는 특성이 있기 때문에, 계대배양 시에는 0.25% 트립신 (trypsin) 용액을 사용하여 단일층을 벗겨 내었다.

< 1-2> 약물의 농도에 따른 세포 증식 실험 : MTT 실험

상기 세포주를 96-웰 플레이트에 20,000 세포수/웰로 접종하고 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 얻은 피하 추출물을 건조약제 해당 $5 \sim 5 \times 10^{-7}$ mg/ml의 농도가 되도록 각 농도별로 6개의 웰에 첨가하였다. 피하 추출물은 비극성이므로 DMSO (dimethylsulfoxide)에 용해시켜 사용하였으며, 배양 조건에서 DMSO의 최종 농도는 1%가 되도록 하였다. 한편 대조군으로는 피하 추출물을 첨가하지 않은 것을 사용하였고, 비교군으로서는 현재 골다공증 치료제로 주로 사용되고 있는 NaF 및 17β -에스트라디올 (E2)과 상기 실시예를 통해 피하 추출물의 성분으로 확인된 포르모노네틴 및 제니스테인, 그리고 비오카닌 A와 $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 를 각각 농도별로 웰에 가하여 사용하였다.

상기에서 준비된 것을 37℃ 배양기에서 3일간 배양하고, 여기에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Triazolyl Blue)를 0.05 mg/ml 농도로 가하여 같은 조건에서 4시간 더 배양하였다. 생성된 포르마잔 (formazan) 결정을 DMSO로 용해시켜 엘리자 판독기 (ELISA reader)로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

세포 증식율 (%)은 하기수학식 1과 같이, 피하 추출물을 첨가하지 않은 대조군 웰의 흡광도에 대한 추출물 첨가 웰의 흡광도의 비로서 계산하였으며, 피하 추출물을 같은 농도로 처리한 6개 웰의 값을 평균하였다.

수학식 1

$$\% = \frac{(\text{추출물 첨가 웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값}) - (\text{빈 웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값})}{(\text{대조군 웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값}) - (\text{빈 웰의 OD}_{550\text{nm}} \text{ 평균값})} \times 100$$

그 결과, 피하 추출물에 의한 조골세포 증식률 (%)을 하기표 2에 나타내었다.

[표 2]

MTT 분석에 의한 Saos-2 세포의 증식 결과

Saos-2 세포 증식률 (%)										
시험군					비교군					
농도(mg/ml)	실시예 1의 피하 추출물	실시예 1의 피하 추출물	농도(mg/ml)	NaF	E2	포르모노네 틴	제니스테인	다이드제인	비오카닌 A	$1,25(\text{OH})_2$ D_3
5×10^{-7}	92.90	98.10	1×10^{-7}	113.52	103.17	104.54	121.88	107.44	97.89	93.58
5×10^{-6}	107.76	103.11	1×10^{-6}	112.62	118.11	100.85	143.58	114.59	103.14	96.01
5×10^{-5}	100.18	118.11	1×10^{-5}	92.02	93.79	104.04	134.77	88.37	106.11	101.55
5×10^{-4}	87.73	98.76	1×10^{-4}	102.93	96.48	98.33	121.37	93.99	75.75	103.93
5×10^{-3}	107.70	106.83	1×10^{-3}	103.56	100.07	82.14	122.95	87.12	105.16	120.88
5×10^{-2}	90.74	98.61	-	-	-	-	-	-	-	-
5×10^{-1}	112.75	119.26	-	-	-	-	-	-	-	-
5	75.71	66.19	-	-	-	-	-	-	-	-

상기표 2에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 의한 피하 추출물은 Saos-2 세포와 같은 조골세포 유사 세포에 대하여 우수한 증식률을 나타내었다. 또한 종래 골다공증 치료제로 사용되고 있는 NaF, E2에 비하여 조골세포 증식률이 더 우수할 뿐만 아니라, 포르모노네틴, 다이드제인 같은 단일 화합물보다 더 높은 세포 증식률을 나타내었다. 따라서 본 발명에 의한 피하 추출물은 골다공증 치료 또는 예방과 관련된 약물 및 건강 식품에 유용하게 사용될 수 있다.

< 1-3> ALP의 활성 검색

조골세포는 ALP 활성을 나타내므로, 본 발명에 의한 피하 추출물이 조골세포에서 ALP 활성에 미치는 영향을 하기와 같은 방법에 의해 알아 보았다.

MTT 실험에서의 동일한 세포수의 Saos-2 세포주에 시험 물질을 동일한 농도로 처리하고 동일한 조건에서 3일간 배양 후 수확하였다. 이 때, 비교군으로는 NaF, E2, 포르포노네틴, 제니스타인, 다이드제인, 비오키닌 A, 1,25(OH)₂D₃를 각각 사용하였다. 한편, ALP가 p-니트로페닐포스페이트(p-nitrophenylphosphate)를 p-니트로페놀(p-nitrophenol)과 포스페이트(phosphate)로 분해시키는 것을 이용하여 405 nm에서의 흡광도의 변화를 이용하여 ALP 활성을 측정하였으며, 그 결과를 하기표 3에 나타내었다.

[표 3]

Saos-2 세포의 ALP 활성 결과

Saos-2 세포의 ALP 활성률 (%)										
시험군					비교군					
농도(mg/ml)	실시에 1의 괴화 추출물	실시에 1의 괴화 추출물	농도(mg/ml)	NaF	E2	포르포노네 틴	제니스타인	다이드제인	비오키닌 A	1,25(OH) ₂ D ₃
5×10 ⁻⁷	94.17	74.09	1×10 ⁻⁷	94.81	96.18	95.73	110.43	101.94	104.74	192.15
5×10 ⁻⁶	93.11	60.41	1×10 ⁻⁶	94.56	100.92	264.12	134.82	99.87	103.52	93.92
5×10 ⁻⁵	74.66	138.01	1×10 ⁻⁵	93.02	98.71	111.38	123.09	103.00	131.27	99.51
5×10 ⁻⁴	96.88	176.70	1×10 ⁻⁴	87.17	90.85	105.69	124.71	93.01	101.94	182.73
5×10 ⁻³	125.65	189.83	1×10 ⁻³	87.05	91.03	90.59	121.47	98.00	98.35	167.46
5×10 ⁻²	102.81	108.60	-	-	-	-	-	-	-	-
5×10 ⁻¹	95.84	87.11	-	-	-	-	-	-	-	-
5	122.65	33.37	-	-	-	-	-	-	-	-

상기표 3에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 의한 괴화 추출물은 Saos-2 세포에 대하여 우수한 ALP 활성률을 나타내었다. 또한 종래 골다공증 치료제로 사용되고 있는 NaF, E2에 비하여 ALP 활성률이 더 우수할 뿐만 아니라, 포르포노네틴, 다이드제인, 제니스타인 등 단일 화합물보다 더 높은 활성률을 나타내었다. 따라서 본 발명에 의한 괴화 추출물은 조골 세포의 활성을 증가시켜 골의 생성을 촉진시킬 수 있으므로, 골다공증 치료 또는 예방과 관련된 약물 및 건강 식품에 유용하게 사용될 수 있다.

< 실험예 2> 난소 적출 환경에 대한 동물 실험

폐경기 이후 타입 I (type I) 골다공증이 일어나는 SD (Sprague-Dawley)계 흰쥐의 암컷을 대상으로 하여 골다공증에 대한 동물 실험을 실시하였다.

< 2-1> 실험 동물 및 실험 단계

실험 재료로는 한국화학연구소에서 분양받은 생후 10주된 체중 200~300 g 정도의 암컷 흰쥐 (Sprague Dawley rat)를 사용하였다. 실험 과정은 크게 흰쥐의 난소 적출술의 시행, 각 군에 따른 약물 투여, 체중변화 측정, 적출술 후 일정 기간 마다 쥐를 희생하여 조직학적 관찰, 조직 형태 계측학적 분석으로 나눌 수 있다.

< 2-2> 난소 적출술 및 약물 투여

난소 적출술은 sham군 (정상군)을 제외하고 대조군과 시험군의 모든 흰쥐 암컷에서 양측 난소 적출술을 시행하였다. 케타민 (ketamine) (유한양행, 대한민국) 5 mg/100 g과 자일라진 (xylazine) (한국 바이엘, 대한민국) 1 mg/100 g을 흰쥐의 좌측 및 우측 후지 대퇴근에 근육 주사하여 흰쥐 암컷을 전신 마취시켰다. 하복부의 털을 제거하고 동물의 체위를 반듯이 눕힌 상태에서 포타단액 (삼일제약: 요오드, 대한민국)으로 수술 부위를 소독한 후, 무균 조작 하에서 수술을 시행하였다. 정중선 (백선)을 중심으로 하복부에서 2 cm 정도로 피부, 복근 및 복막을 절개하고, 소독된 핀셋으로 난소를 노출시켜 난관을 건사로 결찰한 후 좌우 난소를 적출하였다. 항생제 (셀파포르테-4, 유니화학 주식회사) 0.3 ml를 복강 내에 주입하여 감염을 방지하였으며, 건사 및 나일론사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하였다.

Sham군은 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 동물들로 난소를 적출하고 약물 투여를 하지 않은 대조군에 대한 비교군으로 난소 적출로 인한 변화를 대조군과 비교하기 위하여 존재한다. 반면에 대조군은 난소 적출술을 행하고 약물 투여를 실시한 투여군들의 동물들과 비교하여 약물 투여에 기인하는 변화를 비교하기 위한 것이다.

난소를 적출하고 나서 1주 후부터 Sham군과 대조군은 10% Tween 80 용액을, E2군은 17 β -에스트라디올을 1 μ g/kg/day로, 시험 약물 투여군은 시험 약물을 9주 동안 500 mg/ml 농도로 복강 주사 또는 피하 주사하여 동물 실험을 실시하였다. 골밀도 검사를 위해 5, 6번 요추골 (lumbar), 오른쪽 경골 (tibia)을 분리하고 4% 포르말린 (formalin) 용액 (10% 희석액)에 보관하였다.

< 2-3> 약물투여에 의한 체중 및 조직무게의 변화 측정

상기 실험에 < 2-2> 에 의해 난소가 적출된 후 약물이 투여된 실험동물의 체중 및 조직무게를 약물 투여시, 투여 전 후 일정기간 동안 (난소 적출 전 후, 약물 투여 1~9주 동안)을 측정하여 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 Sham군 및 난소를 적출하고 약물 투여를 하지 않은 대조군의 체중 및 조직무게와 비교하였다. 각군의 실험동물의 체중 및 조직무게의 측정 결과를 하기표 4및표 5에 나타내었다

[표 4]

약물투여에 의해 실험동물의 체중변화

주령(week)	Control	Sham	E2	피하 추출물
10	233.47 \pm 6.38	233.29 \pm 5.71	244.97 \pm 8.06	239.63 \pm 8.32
11	256.74 \pm 6.10	242.99 \pm 5.35	262.41 \pm 6.91	256.65 \pm 7.13
12	285.14 \pm 6.03**	251.69 \pm 5.52 [#]	272.33 \pm 7.13	281.93 \pm 8.50*
13	310.79 \pm 5.94**	260.17 \pm 5.64 ^{##}	281.00 \pm 6.30	308.76 \pm 9.36**
14	326.45 \pm 7.09**	270.05 \pm 6.76 ^{***}	293.05 \pm 7.74**	324.62 \pm 10.38**
15	336.18 \pm 7.97**	275.66 \pm 5.70 ^{***}	302.64 \pm 8.78**	330.18 \pm 12.19**
16	345.38 \pm 7.95**	278.34 \pm 6.46 ^{***}	299.82 \pm 7.76**	339.76 \pm 12.60**
17	343.13 \pm 8.12**	282.68 \pm 7.31 ^{***}	306.27 \pm 8.47**	342.91 \pm 11.95**
18	357.26 \pm 8.58**	285.88 \pm 6.72 ^{***}	308.97 \pm 8.56 ^{***}	346.71 \pm 11.77**
19	364.77 \pm 8.59**	292.07 \pm 6.83 ^{***}	319.14 \pm 9.06**	348.82 \pm 11.34**
20	371.21 \pm 8.45**	300.32 \pm 6.95 ^{***}	327.96 \pm 8.22**	356.27 \pm 11.87**

본페로니 다중 비교법 (bonferroni multiple comparison method)으로 비교,

10주령과 비교하여 *: p < 0.05, **: p < 0.01,

대조군과 비교하여 #: p < 0.05, ##: p < 0.01

[표 5]

약물투여에 의해 실험동물의 조직무게의 변화

	자궁 (mg)	간 (g)	신장 (g)	경골 (g)
대조군	83 \pm 6	9.78 \pm 0.30	1.77 \pm 0.05	0.56 \pm 0.02
Sham군	499 \pm 35**	9.27 \pm 0.27	1.90 \pm 0.07	0.55 \pm 0.02
E2	259 \pm 14**	9.78 \pm 0.27	2.03 \pm 0.06	0.55 \pm 0.01
피하	88 \pm 2	9.16 \pm 0.31	1.90 \pm 0.06	0.58 \pm 0.02

본페로니 다중 비교법으로 비교,

대조군과 비교하여 *: p < 0.05, **: p < 0.01,

상기표 4에 나타난 바와 같이, Sham군과 E2가 투여된 실험군에서는 약물투여 기간 동안 대조군에 비하여 체중의 증가가 현저하게 낮은 반면, 본 발명의 피하 추출물이 투여된 실험군에서는 대조군과 거의 동일한 양상으로 체중이 증가되었음을 알 수 있다. 이러한 결과는 정상상태에서는 주령의 증가에 따라 체중이 증가하며 피하 추출물의 투여가 주령 증가에 따른 체중의 증가에 아무런 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

또한, 표 4에 나타난 바와 같이, 각군의 실험동물에서 자궁을 제외한 모든 조직들의 무게는 별다른 차이를 나타내지 않았으나, 자궁의 무게는 Sham군과 E2 투여군에서는 대조군에 비하여 각각 6배 및 3배 정도씩 증가되었으나 피하 추출물 투여군에서는 대조군과 거의 유사하였다.

< 2-4> 병리조직학적 관찰

채취한 대퇴골 조직을 10% 포르말린 용액에 고정한 후, 포름산 내에서 탈회를 실시하였다. 골조직의 관찰 부위를 수술 칼로 절단한 뒤 70~100% 알코올과 아세톤에 이르는 단계별 탈수 과정을 거쳐 자일렌으로 청명하고 파라핀 포매를 실시하였다. 파라핀 포매된 골조직을 마이크로톰으로 5 μ m로 절단하고 헤마톡실린 & 에오신 (hematoxyline & eosin, H & E) 염색을 실시하고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

그 결과, 각 군의 골조직 간에 병리학적인 차이는 관찰되지 않았으므로 시험 약물의 투여로 인한 생체 내 독성은 없는 것으로 판단되었다.

< 2-5> 형태계측학적 분석

각 군의 요추골 및 경골부에서 하기와 같은 방법에 의해 형태계측학적 분석을 실시하였다.

정량적 영상 분석기 (Quantitative image analysis system, Wild Leitz Co.)의 디지털화 장치 (digitizer)로 각 소주의 윤곽선을 따라 그려 컴퓨터 화면에 영상을 얻고 특수한 컴퓨터 체계를 이용하여 이 영상의 면적을 자동적으로 계산하고 이것으로 소주골 (trabecula)의 면적을 구하였다. 각 경골의 근위부에서 성장판의 직하부의 부분 중 가로변의 길이와 성장판 길이의 약 2/3정도 되는 길이로 기준 면적 $2 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ 인 직사각형의 내부에 있는 소주골의 평균 면적을 컴퓨터를 이용하여 구하고, 그 직사각형 내부의 골소주의 개수를 구한 다음 평균 면적에 개수를 곱하여 각각의 골 표본의 소주골 면적을 구한 후 통계 처리하였다. 그 결과를 하기표 6에 나타내었다.

[표 6]

형태계측학적 분석 결과

		오른쪽 경골		요추골	
소주골의 면적($\times 10^4 \mu \text{m}^2$)	대조군에 대한소주골의 면적 (%)	소주골의 면적($\times 10^4 \mu \text{m}^2$)	대조군에 대한소주골의 면적 (%)		
대조군	35.60 \pm 1.30	100.00 \pm 3.65	61.64 \pm 2.70	100.00 \pm 4.38	
Sham군	101.29 \pm 8.79**	284.52 \pm 24.69**	88.11 \pm 4.02**	142.94 \pm 6.52**	
E2	52.44 \pm 2.92*	147.30 \pm 8.20*	76.64 \pm 2.69*	124.33 \pm 4.36*	
피하 추출물	58.09 \pm 2.76**	163.17 \pm 7.75**	78.31 \pm 1.33**	127.04 \pm 2.16**	

본페로니 다중 비교법으로 비교,

대조군과 비교하여 *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$,

상기표 6에서 볼 수 있듯이, 난소 적출한 대조군은 정상 상태 (Sham 군)에 비해 소주골의 면적이 50% 정도 감소되었고, 이는 골다공증이 유발되었음을 나타냈다. 난소 적출로 인한 소주골 면적은 E2나 피하 추출물의 투여로 인해 증가되었는데, 정상군인 Sham군에 비해서는 낮았으나 ($P < 0.01$) 대조군에 비해서는 유의성있게 증가하였다 ($P < 0.05$). 피하 추출물의 투여는 대조군에 비해 약 63% 정도 소주골의 면적을 증가시켰으며, 특히 현재 골다공증의 예방 및 치료제로 사용되는 E2 보다도 소주골의 면적을 더 많이 증가시켰다. 따라서 본 발명에 의한 피하 추출물은 골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 피화 추출물은 종래 식물 에스트로겐의 공급원으로 사용되던 대두 추출물에 비해 제니스테인과 포르모노네티ن 등의 식물 에스트로겐을 다량 포함하고 있으면서 대두에 비해 값이 저렴하므로 새로운 식물 에스트로겐의 공급원으로 유용하며, 다이드제인과 포르모노네티ن을 사용하는 여러 가지 질병의 예방제 및 치료제의 원료 또는 건강식품으로도 사용할 수 있다. 특히 피화 추출물은 식물 에스트로겐 중 단일 화합물이 나타내는 것보다 더 우수한 골다공증 치료 또는 예방 효과를 나타내므로, 골다공증 치료제 또는 예방제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 건강 식품으로도 응용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

골다공증 (osteoporosis) 예방 및 치료에 효과를 갖는 피화 (Sophorae Flos) 추출물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 피화 추출물은 제니스테인 (genistein) 또는 포르모노네티 (formononetin)을 포함하는 것을 특징으로 하는 피화 추출물.

청구항 3.

피화 건조물을 10~100% 알코올 수용액에 넣고 5~40 °C에서 침지하여 제 1 항의 피화 추출물을 제조하는 방법.

청구항 4.

피화 건조물을 0.1~2 N 산 또는 염기 용액으로 가수분해하여 제 1 항의 피화 추출물을 제조하는 방법.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 산은 염산 또는 황산이고 염기는 수산화나트륨 또는 수산화칼륨인 것을 특징으로 하는 제 1 항의 피화 추출물을 제조하는 방법.

청구항 6.

제 1 항의 피화 추출물을 유효 성분으로 함유하는 골다공증 치료제 또는 예방제용 약학적 조성물.

청구항 7.

제 1 항의 피화 추출물을 유효 성분으로 함유하는 건강 식품.